



PATENT

THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re the application of:

FRANK et al.

Serial No.: 09/750,021

Group Art Unit: 1632

Filed: December 29, 2000

For: METHOD FOR THE IDENTIFICATION OF SUBSTANCES MIMICKING MAMMAL
EPITOPES

CLAIM TO PRIORITY

Assistant Commissioner of Patents
Washington, D.C. 20231

Sir:

The benefit of the filing date of the prior foreign application
filed in the following foreign country is hereby requested and the right
of priority provided in 35 U.S.C. §119 is hereby claimed:

Germany Application No. 199 64 046.7 filed 30 December 1999.

In support of this claim, filed herewith is a certified copy of said
foreign application.

Respectfully submitted,

JACOBSON HOLMAN PLLC

By: 

William E. Player

Reg. No. 31,409

400 Seventh Street, N.W.
Washington, D.C. 20004-2201
Telephone: (202) 638-6666

Atty. Docket No.: P66238US0
Date: June 24, 2002
WEP:crj

RECEIVED

JUN 25 2002

TECH CENTER 1600/2900

#8 B.H.
7-18-02

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



RECEIVED
JUN 25 2002
TECH CENTER 1600/2900

Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 199 64 046.7

Anmeldetag: 30. Dezember 1999

Anmelder/Inhaber: Dr. med. Hans-Georg Frank, Aachen/DE

Bezeichnung: Verfahren zur Identifizierung von Substanzen,
die Säugetier-Epitope nachahmen

IPC: A 61 K, C 07 K, C 12 N

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 20. Februar 2001
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Seiler

992686de Me/Sch-br

30. Dezember 1999

Verfahren zur Identifizierung von Substanzen,
die Säugetier-Epitope nachahmen

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von spezifischen monoklonalen immunologischen Bindungsmolekülen mit Bindungsfähigkeit für Epitope von Säugetieren und die immunologischen Bindungsmoleküle sowie ein Verfahren zur Identifizierung von niedermolekularen Substanzen, die die Epitope von Säugetieren nachahmen und die entsprechenden niedermolekularen Substanzen.

Dem Fachmann sind Verfahren zur Herstellung von immunologischen Bindungsmolekülen, insbesondere Antikörpern bekannt. Gängige Verfahren beruhen auf der Immunisierung von Versuchstieren mit Substanzen, gegen die Antikörper erzeugt werden sollen. Zur Verstärkung der Immunantwort werden im Normalfall Adjuvantien hinzugegeben, die stark wirkende Immunogene enthalten. Die durch eine oder mehrfache Immunisierung erreichte Immunantwort im Versuchstier kann in Form polyklonaler Antikörperseren verwendet werden oder durch die Hybridomtechnik immortalisiert werden und wird gegebenenfalls gefolgt von einer Monoklonalisierung durch Vereinzelung.

Alternativ kann auch die in den Zellen enthaltene genetische Information über die Struktur der Antikörper verwendet werden, um synthetische Bindungsmoleküle wie beispielsweise single chain Antikörper zu erhalten.

Alle diese Verfahren beruhen auf der ursprünglichen Immunisierung des Versuchstieres und sind daher von der Qualität der dadurch erzeugten Immunantwort abhängig. Hierbei ist zu berücksichtigen, dass für eine Immortalisierung der Immunantwort mit Hilfe der Hybridomtechnik nahezu ausschließlich Mäuse zur Immunisierung verwendet werden, da nur für Labornager entsprechende immortalisierte Myelomzellen zur Verfügung stehen.

Bei der üblichen Immunisierung von Mäusen oder Kaninchen werden nur dann gute Immunantworten erreicht, wenn das entsprechende Protein vom Versuchstier als "fremd" erkannt wird. Dies ist insbesondere dann problematisch, wenn es sich bei den relevanten Strukturen um Strukturen handelt, die über einen langen Abschnitt der Evolution konserviert wurden.

In vielen Fällen ist es von besonderem Interesse auch die Struktur der als immunogen wirkenden Substanzen zu ermitteln. Soweit es sich dabei beispielsweise um einfache Peptide und Proteine handelt, können diese mittels der gewonnenen immunologischen Bindungsmoleküle identifiziert und durch chromatographische Verfahren isoliert und charakterisiert werden. Die genaue Strukturaufklärung folgt dann beispielsweise durch Proteinsequenzierung.

Handelt es sich bei den immunogenen Strukturen jedoch um Verbindungen komplexer Struktur, z.B. durch Beteiligung von Lipidstrukturen ist eine Charakterisierung erschwert, da solche Verbindungen bei einer Aufreinigung häufig ihre Struktur verlieren und somit auch nicht mehr von den immunologischen Bindungsmolekülen erkannt werden. In einem solchen Fall wären Substanzen von großem Interesse, die identische räumliche Strukturen aufweisen, da diese

- 3 -

möglicherweise als Bestandteil von Vakzinen verwendet werden könnten, um hiermit eine Immunisierung zu erreichen.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, die genannten Probleme und Nachteile des Standes der Technik zu überwinden.

In einem Aspekt der Erfindung wird die Aufgabe gelöst durch ein Verfahren zur Herstellung von spezifischen monoklonalen immunologischen Bindungsmolekülen mit Bindungsfähigkeit für Epitope von Säugetieren umfassend folgende Schritte

- a) Isolierung von Strukturen, die die Epitope enthalten, um eine Epitop-Präparation zu erhalten
- b) Immunisierung von Nicht-Säugetieren mit der Epitop-Präparation, um eine Immunantwort zu erhalten
- c) Immortalisierung der Immunantwort, um eine Bibliothek immunologischer Bindungsmoleküle zu erhalten
- d) Selektion der immunologischen Bindungsmoleküle an den Epitopen, um spezifische monoklonale immunologische Bindungsmoleküle zu erhalten.

Dabei ist ein "immunologisches Bindungsmolekül" ein Molekül, das direkt oder indirekt durch Immunisierung erhalten wird und andere Moleküle binden kann. Der Begriff umfasst insbesondere Antikörper und Antikörperfragmente sowie single chain Antikörper.

"Spezifische immunologische Bindungsmoleküle" bedeutet, dass diese Bindungsmoleküle andere Substanzen mit einer Dissoziationskonstante K_d von weniger als 10^{-5} , vorzugsweise zwischen 10^{-6} und 10^{-12} mol/l binden.

"Monoklonale immunologische Bindungsmoleküle" sind solche, die von einer Mehrzahl von Zellen gebildet werden können, wobei alle Zellen jedoch identische Bindungsmoleküle exprimieren.

"Immortalisierung der Immunantwort" bedeutet, dass die erhaltene Immunantwort in eine Form überführt wird, die es erlaubt, über einen längeren Zeitraum entsprechende Bindungsmoleküle von Zellen in vitro erzeugen zu lassen.

"Bibliothek immunologischer Bindungsmoleküle" bedeutet eine Vielzahl von verschiedenen Bindungsmolekülen, die noch so mit ihrer DNA-Information verbunden sind, dass durch Vereinzelung von Mitgliedern monoklonale Bindungsmoleküle erhalten werden können.

"Selektion immunologischer Bindungsmoleküle" bedeutet ein Verfahren, bei dem die Bindungsfähigkeit der Bindungsmoleküle an Substanzen getestet wird und Moleküle isoliert werden, die besonders hohe Bindungsaffinitäten zeigen.

Das Verfahren eignet sich insbesondere für konservierte Epitope. "Konservierte Epitope" von Säugetieren sind insbesondere solche, die

- a) bei verschiedenen Säugetierspezies auftreten und
- b) relativ geringe Speziesunterschiede aufweisen, sowie gegebenenfalls
- c) dadurch gekennzeichnet sind, dass Konsensussequenzen oder Konsensusstrukturen mindestens für die Säugetiere definieren lassen, wobei c) nur zum Tragen kommt, wenn es sich um ein Epitop handelt, von dem aufgrund seiner stofflichen Natur Sequenzdaten ermittelbar sind.

Konservierte Epitope von Säugetieren sind in Nicht-Säugetieren stärker

- 5 -

immunogen als in Säugetieren.

Hierin werden insbesondere - neben diesem aus der Phylogenese abgeleiteten Begriff - auch alle ontogenetisch relevanten menschlichen Epitope unter dem Begriff "konservierte Epitope" verstanden, die

a) im menschlichen Trophoblastgewebe, in menschlichen embryonalem Gewebe und/oder in maligne entarteten Zellen und Geweben bzw. Zwischenstadien zwischen normalem und maligne entartetem Gewebe exprimiert werden und

b) in den zu den maligne entarteten Zellen korrespondierenden normalen, gewebstypisch ausdifferenzierten, adulten Zellen und Geweben nicht exprimiert werden und

c) dadurch charakterisiert sind, dass sie in Säugetieren in der Regel schwächer immunogen sind als in Nicht-Säugetieren, die weder Trophoblast noch Placenta aufweisen.

Die bevorzugte Spezies zur Immunisierung sind Hühner.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung ist ein Verfahren zur Identifizierung von niedermolekularen Substanzen, die Epitope von Säugetieren nachahmen, wobei mit gemäß dem oben genannten Verfahren erhaltenen spezifischen monoklonalen immunologischen Bindungsmolekülen aus einer Bibliothek niedermolekularer Substanzen solche mit einer hohen Bindungsaffinität zu den immunologischen Bindungsmoleküle identifiziert werden. Entsprechende Moleküle ahmen somit die native Struktur der ursprünglich eingesetzten Epitope nach, können jedoch aus grundsätzlich anderen Stoffklassen gewählt sein; sie weisen ähnliche stereochemische Eigenschaften auf.

Die bevorzugte Säugetierspezies, deren Epitope von Interesse sind, ist

- 6 -

Homo sapiens. Die Bibliothek niedermolekularer Substanzen enthält bevorzugt Peptide, und zwar insbesondere in Form einer Phagen-Peptidbibliothek. Bevorzugterweise umfassen die Peptide 7 bis 15 Aminosäuren, noch mehr bevorzugt 9 oder mehr bzw. 12 oder weniger Aminosäuren.

Gegenstand der Erfindung sind auch die immunologischen Bindungsmoleküle, die durch das erfindungsgemäße Verfahren erhalten werden können, ein Diagnostikum, das die immunologischen Bindungsmoleküle enthält, eine niedermolekulare Substanz, die durch das erfindungsgemäße Verfahren zur Identifizierung der niedermolekularen Substanzen identifiziert werden kann und ein Arzneimittel, das eine der erfindungsgemäßen niedermolekularen Substanzen enthält.

In einer bevorzugten Ausführungsform lassen sich die erfindungsgemäßen Verfahren einsetzen zur Erzeugung eines Impfstoffes zur Empfängnisverhütung.

Die WO-A-93/06857 beschreibt bereits einen Impfstoff zur Empfängnisverhütung, bei dem eine Proteinzusammensetzung, das aus Trophoblastenmembranen aufgereinigt wird, als Impfstoff verwendet wird. Aufgrund der geringen Immunogenität humaner Epitope im Menschen sind hiermit nur geringe Erfolge zu erwarten.

Beim Menschen implantiert sich der frühe Embryo als Blastozyste invasiv im stromalen Anteil des Endometriums, d.h. die Blastozyste durchdringt das Epithel des Uterus und es erfolgt eine interstitielle Implantation. Die eindringende Zellpopulation ist die äußere, epithellale Lage von Zellen, der sogenannte Trophoblast. Die interstitielle Implantation kommt beim Menschen und einer Reihe von verwandten Säugetieren, wie z.B. Mäusen und Ratten vor. Während der gesamten Schwangerschaft durchdringen einzelne Trophoblastenzellen die

- 7 -

mütterlichen Gewebe bis in den Bereich der endometrial/myometrialen Übergangszone, durchdringen die Wand mütterlicher Arterien und ersetzen an dieser Stelle das Endothel. Beim Durchdringen des uterinen Epithels fusionieren die Zellen des Trophoblasten zu einem synzytialen Verband, ein Vorgang, der für eine erfolgreiche Implantation unerlässlich ist. Der Vorgang der trophoblastären Synzytiogenese wird durch Signalepitope ausgelöst, von denen bisher nur bekannt ist, dass ein "Flip" von Phosphatidylserin auf die Außenseite der Plasmamembran an ihrer Entstehung beteiligt ist. So ist bekannt, dass

- a) Frauen mit erhöhtem anti-Phospholipid Antikörpern (z.B. bei Lupus erythematoses) vermehrt Probleme mit Schwangerschaften haben und teilweise infertil sind,
- b) die Externalisierung von Phosphatidylserin auf die Außenseite der Plasmamembran der synzytialen Fusion unmittelbar vorausgeht,
- c) Antikörper, die gegen Phosphatidylserin in Versuchstieren induziert wurden, die synzytiale Fusion in vitro hemmen können.

Der Flip von Phosphatidylserin ist kein trophoblastspezifisches Phänomen, sondern ein Ereignis, das im Rahmen jeder Apoptose im Körper auftritt. Apoptotische Zellen fusionieren nur selten und stets nur mit gleichartigen Zellen. Es werden daher weitere, eventuell mit Phosphatidylserin assoziierte Epitope postuliert, die das gewebsspezifische Ereignis der synzytialen Fusion nur im Trophoblasten, bei der Genese von Skelettmuskelfasern und bei Osteoklasten auslösen. Da es sich bei diesen, unter Beteiligung von Phosphatidylserin entstehenden Epitopen nicht um reine Proteinepitope handelt, sind sie biochemisch nur schwer isolier- und charakterisierbar.

Mit Hilfe des erfindungsgemäßen Verfahrens können Substanzen isoliert werden, die als Vakzine geeignet sind, die synzytiale Fusion zu hemmen. Hierzu können beispielsweise Trophoblasten-Präparationen verwendet werden, um Hühner zu immunisieren. Da Hühner weder Trophoblast noch Trophoblastimplantation aufweisen sowie demzufolge eine gänzlich andere, auf der Ablage von befruchteten Eiern beruhende Reproduktion aufweisen, sind sie in der Lage, hierauf eine hinreichende Immunantwort zu produzieren. Die Immunantwort lässt sich dann beispielsweise mittels der Phagen Display-Technik als Phagenbibliothek immortalisieren. Aus diesen Phagen-Bibliotheken werden solche single chain Antikörper isoliert, die spezifisch an Trophoblast-Zellen binden. Als alternativer oder zusätzlicher Selektionsschritt können auch solche single chain Antikörper selektiert werden, die die synzytiale Fusion hemmen können. Die so isolierten Antikörperstrukturen können nun wiederum benutzt werden, um Substanzen zu isolieren, die die Struktur der Trophoblasten-Epitope nachahmen. Beispielsweise können Substanz-Bibliotheken wie Peptid-Bibliotheken, die gegebenenfalls ebenfalls als Phagen Display libraries vorliegen können, gescreent werden. Da es sich bei den so erhaltenen Peptiden um "mimics" der ursprünglichen Epitope handelt, können diese zur Grundlage der Entwicklung von Impfstoffen gemacht werden, die nach Antikörperproduktion im Säugetier wiederum hemmend auf die synzytiale Fusion wirken und somit eine empfängnisverhütende Wirkung aufweisen.

Die erfindungsgemäßen Verfahren und Verbindungen lassen sich darüber hinaus auch in der Tumordiagnostik und Behandlung einsetzen. Die oben beschriebene Durchwanderung von Gewebe durch epitheliale Zellen, die sich von ihrer Basalmembran abgelöst haben, ist außerhalb der Schwangerschaft nur in malignen Tumoren, insbesondere in den von

Epithel- und Drüsengewebe abstammenden Carcinomen zu beobachten.

Die Invasion maligne entarteter Epithel-Zellen hat ihre ontogenetischen Vorläufer in der invadierenden Trophoblastzelle. Daher weisen beide invasive Situationen Ähnlichkeiten auf:

- a) Obwohl maligne entartete Zellen sich genetisch und phänotypisch von den normalen Körperzellen unterscheiden, gibt es keine klinisch wirksame Immunantwort gegen diese Zellen. In gleicher Form wird menschlicher Trophoblast nicht abgestoßen, obwohl es sich formal sogar um ein allohaploides Transplantat handelt. In beiden Vorgängen kommt es nicht zu der erwarteten T-Zell vermittelten Immunantwort.
- b) Viele Moleküle, die während der Schwangerschaft im Trophoblasten exprimiert werden, treten in normalen adulten Geweben nicht mehr auf. Sie können aber während der malignen Entartung reexprimiert werden. Diejenigen Epitope, die sowohl während der Fetalzeit als auch im Rahmen der Carcinogenese exprimiert werden, werden als oncofetale Epitope bezeichnet. Aufgrund der weitgehenden Analogien zwischen Trophoblast-Invasion und Tumor-Invasion

besteht im Bereich der Tumordiagnostik und Tumorthherapie ein weiteres Anwendungsgebiet der erfindungsgemäßen immunologischen Bindungsmoleküle und der niedermolekularen Substanz.

Weitere Epitope, für die das erfindungsgemäße Verfahren von besonderem Wert sein könnte, sind

- a) Epitope, die durch oligo- bis polymere Kohlehydrate gebildet werden, unabhängig davon, ob diese selbständig existieren oder in Verbindung mit

- 10 -

Proteinen, Lipiden oder Nukleinsäuren auftreten,

b) Epitope, die durch Assoziation von Untereinheiten an der Oberfläche von Zellen entstehen, insbesondere Rezeptormoleküle sowie Zell-Zell und Zell-Matrix Kontaktmoleküle

Figur 1 zeigt ein Agarosegel der Inserts einiger Mitglieder einer Phagenbibliothek. Zur Überprüfung der Diversität der kumulativen Bibliothek wurden 9 Klone willkürlich gepickt, die Plasmide isoliert und die Inserts in einer PCR amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden gereinigt, mit *MspI* restringiert, in einem 2% Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt. Die Probenreihen sind von links nach rechts wie folgt in aufsteigender Nummerierung angeordnet. Reihe 1: 100 bp Größen-Leiter; Reihe 2: ϕ X174/*HaeIII*; Reihe 3-11: Klone 1-9. Dies zeigt, dass die Bibliothek nicht von wenigen Klonen dominiert wird.

Beispiel

Die folgenden Ausführungen stellen ein Beispiel für die Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens dar. Das Beispiel umfasst die Schritte der Immunisierung eines Nicht-Säugetieres mit verschiedenen Antigen-Präparationen, die Erstellung einer Phagen-Bibliothek sowie die Selektion spezifischer immunologischer Bindungsmoleküle im Sinne des Verfahrens.

Immunisierung der Tiere

12 "white leghorn" Hühner im Alter von 6 bis 18 Monaten wurden immunisiert. Die Immunisierungsprotokolle wurden auf publizierten Standardschemata aufgebaut (Gassmann, M. et al. *FASEB J* (1990) 4:2528-2532) und umfassten eine erste Injektion der Antigenpräparation (siehe Tabelle 2) in komplettem Freund'schem

Adjuvans, die von zwei Booster-Injektionen im Abstand von jeweils 2 bis 4 Wochen gefolgt wurden. Booster-Injektionen wurden mit inkomplettem Freund'schem Adjuvans durchgeführt. Falls mit lebenden menschlichen Zellen immunisiert wurde, wurden pro Injektion eine Million Zellen ohne Adjuvans verabreicht (siehe auch Tabelle 2). 5 Tage nach der letzten Injektion wurden die immunisierten Tiere getötet, die Milzen entfernt und in steriler isotoner Lösung ins Labor verbracht.

Präparation von Splenozyten, Gesamt-RNA und cDNA

Unter sterilen Bedingungen wurde die Milz in 8-10 kleine Stücke zerteilt. Diese Stücke wurden in einem Elvehjem Glasröhrchen mit Hilfe des passenden Pistills vorsichtig von Hand weiter in 3 ml steriler isotoner Salzlösung suspendiert. Diese Suspension wurde durch ein Edelstahlsieb (150 mesh) filtriert, die im Filtrat enthaltenen Milzzellen pelletiert (400g, 5 min. Raumtemperatur) und anschließend in Lyse-Puffer (0.15 M NH_4Cl ; 1 mM KHCO_3 ; 0.1 mM Na_2EDTA ; pH 7.2) die Erythrozyten selektiv lysiert. Aus den verbleibenden Splenozyten wurde die Gesamt-RNA präpariert sowie cDNA nach einer reversen Transkription mit oligo-dT Primern hergestellt.

Polymerase-Ketten Reaktionen (PCR) für die Bibliothekserstellung

Primer, die benutzt werden können, um die variablen Regionen von leichter (Vk) und schwerer Kette (Vh) der Immunglobulin-cDNAs zu amplifizieren, sind in Tabelle 1 zusammengefasst (Andris-Widhopf, J. et al. *J Immunol.* 2000 (in press)). Die PCR wurde mit folgenden Parametern durchgeführt: Die initiale Denaturierung wurde für 1 min bei 94°C durchgeführt, gefolgt von 30 Zyklen mit 15 s Denaturierung (94°C), 15 s Annealing (56°C) und 90 s Elongation (74°C). Die Primer führen einen Überlappungsbereich ein, der für die splice overlap

extension PCR bei der Erstellung der für scFv codierenden Abschnitte benötigt wird. Die PCR führt zu Produkten von ca. 350 bp Größe. Nach gründlicher Reinigung der Produkte wurden diese für die splice overlap extension PCR eingesetzt.

Splice overlap extension PCR

Äquimolare Mengen (je 100 ng) der Amplifikate von V_k und V_h wurden in der splice overlap extension PCR eingesetzt. Weiterhin enthielten die Reaktionsmischungen ein Paar speziell definierter Primer (Siehe Tabelle 1; Andris-Widhopf, J. et al. *J Immunol.* 2000 (in press)), zusammengefasst, die unter anderem die für die Restriktion und Ligation benötigten Restriktionsschnittstellen in das Produkt einführen. Nach initialer Denaturierung bei 94°C für 1 min. folgten 35 Zyklen mit 15 s Denaturierung (94°C), 15 s Annealing (56°C) und 120 s Elongation (74°C). Das gewünschte Produkt hat eine Größe von 750 bp.

Vektor und Ligation

Verwendet wurde der Vektor pComb3H-SS (Barbas, CF 3rd. *Curr. Opin. Biotechnol.* (1993) 4:526-530, Biassoni, R. et al. *Semin. Cancer Biol.* (1999) 9:13-18, Siegel, D.L. et al. *J Immunol. Methods* (1997) 206:73-85, Andris-Widhopf, J. et al. *J Immunol.* 2000 (in press)).

Dieser Vektor sowie die oben beschriebenen Primer wurden im Scripps Research Institut, La Jolla, Kalifornien, USA, speziell für das Phage Display von Antikörperbibliotheken hergestellt und entworfen.

Vor der Ligation wurde der Vektor durch Verdau mit *Sfi* I linearisiert. Da der Vektor zwei asymmetrische Schnittstellen dieses Restriktionsenzym enthält, ist nach Verdau und Reinigung des Vektors eine direktionelle Klonierung direkt ohne weiteren Verdauungsschritt möglich. Parallel dazu wurde auch das Produkt der splice overlap

extension PCR mit dem Enzym verdaut und das restringierte Produkt gereinigt.

Erstellung der Phagen-Antikörper Bibliotheken

Präparierter Vektor (14 µg) und PCR-Produkt (10 µg) wurden zusammen in der Gegenwart von 20 U T4-ligase über Nacht bei 4°C inkubiert, die Reaktionsprodukte mit Ethanol präzipitiert und in 50 µl Aqua Bidestillata resuspendiert. Mit dieser DNA Lösung wurden elektrokompente E.coli (XL-1 Blue) transformiert. Die Anzahl der Transformanten wurde durch Titerung auf LB-Ampicillin Platten bestimmt (Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. Cold Spring Harbor Laboratory (1989), Cold Spring Harbor, N.Y.) und die Phagen-Bibliotheken nach Superinfektion der transformierten E.coli mit dem Helferphagen M13KO7 geerntet. Die in Phagenform vorliegenden Bibliotheken wurden sowohl einzeln als auch als gemischte Gesamtbibliothek (kumulative Bibliothek) gelagert.

Um einen Eindruck von der Diversität der Bibliothek zu bekommen und die Dominanz einiger weniger Klone auszuschließen, wurden die Bandenmuster von 9 zufällig gezogenen Klonen nach Restriktion des Inserts analysiert (s. Figur 1)

Selektion spezifischer Phagen-Antikörper aus der kumulativen Bibliothek

Als Antigen für die Selektion wurde die Kombination von Phosphatidylserin mit beta-2-Glycoprotein 1 (GP1) ausgewählt. Es ist bekannt, dass Autoantikörper gegen dieses Kombinationsepitop mit Störungen der synzytialen Fusion assoziiert sind. Die Autoantikörper sind dadurch charakterisiert, dass sie an Phosphatidylserin, das auf der Außenseite der Zellen kurz vor der Fusion auftritt, in Gegenwart von GP1 binden.

Um Antikörper mit einer Spezifität zu gewinnen, die dieser vergleichbar ist, wurde folgende Selektionsstrategie durchgeführt:

- 1) 0.1 µg Phosphatidylserin wurden in 100 µl Ethanol gelöst und in einem ELISA Well bei 37°C aufgebunden.
- 2) Das Well wurde 3 mal 5 min. mit Aqua bidest. gewaschen.
- 3) Das Well wurde mit phosphatgepufferter (pH 7.2) isotoner Salzlösung (enthaltend: 10% fetales Kälberserum) inkubiert (30 Minuten bei 37°C). Parallel dazu wurden auch die zu selektierenden Phagen mit derselben Lösung bei denselben Bedingungen in einem nicht mit Phosphatidylserin beschickten Well inkubiert. Das Kälberserum dient dabei sowohl als Blockierungsreagenz wie auch als Quelle für GP1. Menschliches und bovines GP1 sind hochhomologe Proteine, die beide von den menschlichen Autoantikörpern mit erkannt werden.
- 4) Die Phagensuspension wurde in das phosphatidylserinhaltige Well gegeben und 1 h bei 37°C inkubiert.
- 5) Nach dieser Inkubationszeit wurde die phagenhaltige Suspension aus dem Well entfernt und mit phosphatgepufferter (pH 7.2) isotoner Salzlösung (enthaltend: 10% fetales Kälberserum) mindestens 3 mal 5 min. gewaschen, um unspezifisch bindende Phagen sowie solche Phagen, die mit GP1 alleine reagieren, zu entfernen.
- 6) Bindende Phagen wurden mit Glycin-Puffer (pH 2.2) eluiert, die Lösung neutralisiert und die gewonnenen Phagen wurden zur Infektion von E.coli XL-1Blue verwendet. Nach Amplifikation der eluierten Phagen in E.coli über Nacht wurden die produzierten Phagen geerntet und bei Schritt 1 wieder in den Zyklus eingeführt. Die Schritte von 1 bis 5 wurden so insgesamt fünfmal nacheinander durchlaufen. Dabei wurde die Stringenz der Waschschrte in Schritt 5 bei jedem Zyklus durch längeres Waschen erhöht.

- 15 -

Aus der nach dem letzten Zyklus gewonnen Phagenpopulation wurden 15 zufällige Klone isoliert und monoklonale Phagensuspensionen durch Kultur über Nacht hergestellt.

Die isolierten Klone sowie die unselektierten Phagen der kumulativen Bibliothek wurden in einem Phagen-ELISA auf ihre Reaktivität mit Phosphatidylserin getestet.

Dazu wurden die Schritte 1 bis 5 wie oben beschrieben durchlaufen. Anschließend wurden die Wells mit einem kommerziellen Maus-Antikörper gegen die Phagen sowie mit einem Peroxidase-gekoppelten Antikörper gegen Maus-Immunglobuline inkubiert. Die Peroxidase wurde durch eine chromogene Reaktion nachgewiesen und die Farbstoffmenge im ELISA-Reader photometrisch bestimmt. Höhere Extinktion zeigt eine höhere Anzahl bindender Phagen an. Die Ergebnisse für 15 Klone und die kumulative Bibliothek sind in Tabelle 3 zusammengefasst. Unter den 15 Klonen sind mehrere (1,2,4,8,10 und 15), die sehr viel stärker an Phosphatidylserin binden als die Phagen der kumulativen Bibliothek. Dies belegt die erfolgreiche Anreicherung und Selektion spezifisch bindender Antikörper aus der kumulativen Bibliothek.

Tabellen**Tabelle 1: Sequenzen der Primer für die Amplifikation von Vh und Vk sowie die overlap extension PCR**

Acronym	<u>PCR: Vh und Vk</u>
	a) Vk
CSCVK	5'GTGGCCCAGGCGGCCCTGACTCAGCCGTCCTCGGTGTC3'
CKJo-B	5'CGAAGATCTAGAGGACTGACCTAGGACGGTCAGG3'
	b) Vh
CSVHo-F	5'GGTCAGTCCTCTAGATCTTCCGCCGTGACGTTGGACGAG3'
CSCG-B	5'CTGGCCGGCCTGGCCACTAGTGGAGGAGACGATGACTTCGGTCC3'
	<u>Overlap-extension PCR</u>
CSC-F	5'GAGGAGGAGGAGGAGGAGGTGGCCAGGCGGCCGTGACTCAG3'
CSC-B	5'GAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGCTGGCCGGCCTGGCCACTAGTGGAGG3'

- 17 -

Tabell 2: Bezeichnung, Antigen und Größe (Anzahl der Transformanten) pro Bibliothek

Phage (PDL)	Display	Library	Antigen	Transformanten
PDL 1-4			Homogenat reifer menschlicher Placenta	$1.2 \cdot 10^9$
PDL 5			Lebende Zellen, Trophoblast-Zelllinie AC1-1	10^7
PDL 6			Lebende Zellen; Trophoblast-Zelllinie Jeg-3	$9.1 \cdot 10^7$
PDL 7			Lebende Zellen; Trophoblast-Zelllinie AC-1M88	$8.6 \cdot 10^7$
PDL 8			Primärer Zottentrophoblast, frisch isoliert aus einer reifen Placenta	$1.8 \cdot 10^9$
PDL 9			Primärer invasiver Trophoblast, frisch isoliert aus Eihäuten einer reifen Placenta	$3.8 \cdot 10^7$
PDL 10			Lebende Zellen; Trophoblast-Zelllinie AC-1M32	$3.1 \cdot 10^7$
PDL 11			Lebende Zellen; Trophoblast-Zelllinie AC-1M59	$2.1 \cdot 10^7$
PDL 12			gereinigtes humanes beta-2-Glycoprotein I	$2 \cdot 10^8$
PDL 15			Homogenat von Placenta der Ratte	$4.7 \cdot 10^7$
PDL Bibliothek)		(kumulative Bibliotheken)	Mischung aller Phagen-Bibliotheken	Gesamt: $4 \cdot 10^9$

- 18 -

Tabelle 3: Vergleich der 15 Klone mit der Ausgangsbibliothek im Phagen-ELISA

Phagenpopulation	Anzahl applizierter Phagen pro well	PHS-gecoatetes well (Extinktion)	Kontroll-well ohne PHS(Extinktion)
Klon 1	10^9	1,04	0,34
Klon 2	10^9	0,99	0,28
Klon 3	10^9	0,43	0,29
Klon 4	10^9	0,99	0,24
Klon 5	10^9	0,33	0,27
Klon 6	10^9	0,78	0,22
Klon 7	10^9	0,34	0,29
Klon 8	10^9	0,96	0,27
Klon 9	10^9	0,62	0,32
Klon 10	10^9	1,22	0,34
Klon 11	10^9	0,28	0,34
Klon 12	10^9	0,67	0,30
Klon 13	10^9	0,54	0,33
Klon 14	10^9	0,87	0,29
Klon 15	10^9	1,21	0,34
Kumulative Bibliothek	10^9	0,31	0,26

PHS: Steht als Abkürzung für Phosphatidylserin

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von spezifischen, monoklonalen immunologischen Bindungsmolekülen mit Bindungsfähigkeit für Epitope von Säugetieren umfassend folgende Schritte
 - a) Isolierung von Strukturen, die die Epitope enthalten, um eine Epitop-Präparation zu erhalten
 - b) Immunisierung von Nicht-Säugetieren mit der Epitop-Präparation, um eine Immunantwort zu erhalten
 - c) Immortalisierung der Immunantwort, um eine Bibliothek immunologischer Bindungsmoleküle zu erhalten
 - d) Selektion der immunologischen Bindungsmoleküle an den Epitopen, um spezifische, monoklonale immunologische Bindungsmoleküle zu erhalten.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die monoklonalen, immunologischen Bindungsmoleküle Antikörper oder Antikörperfragmente, insbesondere single chain Antikörper (scFv) sind.
3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Epitope auf den Oberflächen von Zellen, insbesondere von Trophoblasten oder Tumorzellen exprimiert werden.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um onkofetale Epitope oder um Epitope handelt, die an der synzytialen Fusion von Trophoblasten beteiligt sind.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Säugetierspezies Homo sapiens ist.
6. Verfahren zur Identifizierung von niedermolekularen Substanzen, die Epitope von Säugetieren nachahmen, wobei mittels der gemäß dem Verfahren der Ansprüche 1 bis 5 erhaltenen spezifischen, monoklonalen immunologischen Bindungsmoleküle aus einer Bibliothek niedermolekularer Substanzen Substanzen mit einer hohen Bindungsaffinität identifiziert werden.
7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Bibliothek niedermolekularer Substanzen Peptide enthält.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Bibliothek niedermolekularer Substanzen eine Phagen-Peptidbibliothek ist.
9. Immunologisches Bindungsmolekül erhältlich durch ein Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 5.
10. Diagnostikummittel enthaltend mindestens ein immunologisches Bindungsmolekül gemäß Anspruch 9.
11. Niedermolekulare Substanz erhältlich durch ein Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 6 bis 8.

- 21 -

12. Niedermolekulare Substanz gemäß Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um ein Peptid handelt.
13. Niedermolekulare Substanz gemäß Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass das Peptid 7 bis 15 Aminosäuren umfasst.
14. Arzneimittel enthaltend mindestens eine niedermolekulare Substanz gemäß einem der Ansprüche 11 bis 13.
15. Verwendung der niedermolekulare Substanz nach einem der Ansprüche 11 bis 13 zur Herstellung eines Impfstoffes zur Kontrazeption oder zur Herstellung eines Impfstoffes zur Tumorbehandlung.

Zusammenfassung

Verfahren zur Herstellung von spezifischen, monoklonalen immunologischen Bindungsmolekülen mit Bindungsfähigkeit für Epitope von Säugetieren umfassend folgende Schritte

- a) Isolierung von Strukturen, die die Epitope enthalten, um eine Epitop-Präparation zu erhalten
- b) Immunisierung von Nicht-Säugetieren mit der Epitop-Präparation, um eine Immunantwort zu erhalten
- c) Immortalisierung der Immunantwort, um eine Bibliothek immunologischer Bindungsmoleküle zu erhalten
- d) Selektion der immunologischen Bindungsmoleküle an den Epitopen, um spezifische, monoklonale immunologische Bindungsmoleküle zu erhalten.

Mittels der erhaltenen spezifischen, monoklonalen immunologischen Bindungsmoleküle können aus einer Bibliothek niedermolekularer Substanzen Substanzen mit einer hohen Bindungsaffinität identifiziert werden, die die Epitope von Säugetieren nachahmen.

1/1

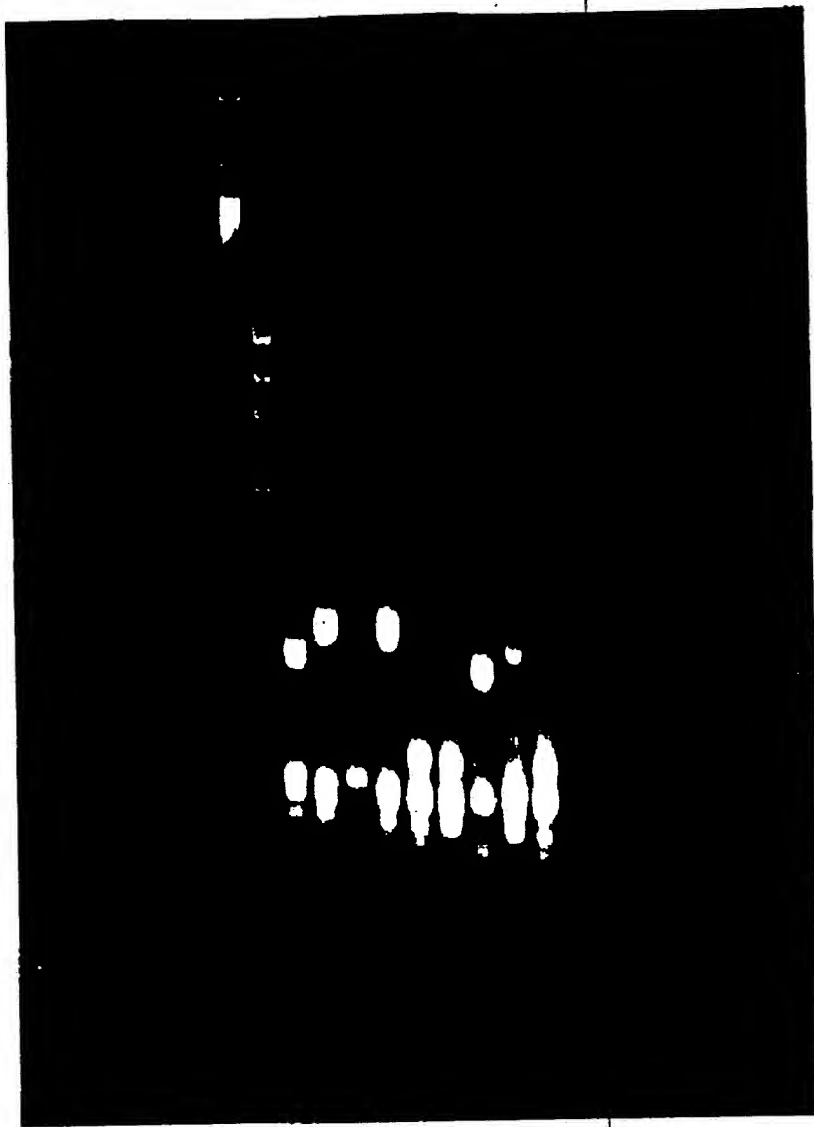


Fig. 1